

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 17 669.1  
**Anmeldetag:** 17. April 2003  
**Anmelder/Inhaber:** Leica Microsystems Heidelberg  
GmbH, 68165 Mannheim/DE  
**Bezeichnung:** Verfahren zur Separierung von Detektions-  
kanälen eines mikroskopischen Systems  
**IPC:** G 01 J 3/28

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 29. Januar 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**Hintermeier**

**Verfahren zur Separierung von Detektionskanälen eines  
mikroskopischen Systems**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Separierung von Detektionskanälen eines mikroskopischen Systems.

5 Die deutsche Patentanmeldung DE 100 06 800.6 offenbart eine Vorrichtung zur Selektion und Detektion mindestens eines Spektralbereichs eines spektral aufgefächerten Lichtstrahls (SP-Modul). Im aufgefächerten Lichtstrahl sind Selektionsmittel vorgesehen, die als Schieber ausgebildet sind, um somit Teile des aufgefächerten Lichtstrahls auf verschiedene Detektoren zu lenken. Auch  
10 andere geeignete Selektionsmittel zur Auswahl des Spektralbereichs sind möglich, wie z.B. Mikrospiegel-Arrays. Die Signale der Detektoren werden dann zur Bildzeugung verwendet. Die Qualität des Bildes hängt dabei besonders von der Lage der Schieber ab. Der Benutzer muss dabei die Schieber entsprechend der Lage der verschiedenen in der Probe  
15 vorhandenen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe einstellen. Für den Benutzer ist dies zeitaufwendig und erfordert eine gute Kenntnis der Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe.

A3005DE zeigt den prinzipiellen Aufbau eines Scanmikroskops zum Benutzertraining. Dieses Benutzertraining erlaubt es, dass ein Benutzer die  
20 Einstellvorgänge eines Scanmikroskops lernt, ohne dass hierzu ein Objekt bzw. eine Probe während der gesamten Lernphase benötigt wird. Mit dem Scanmikroskop ist ein Softwaremodul verbunden, das interaktiv ausgebildet ist. In dem speziellen interaktiven Softwaremodul wird die Arbeitsweise eines SP Moduls simuliert, das heißt, es werden spektrale Bänder mehrerer  
25 Fluoreszenzfarbstoffe aus dem Datensatz separiert, aufakkumuliert, zu unterschiedlichen Kanälen zusammengefasst und mehrfarbig dargestellt. Alle

Möglichkeiten der Software eines konfokalen Scanmikroskops kommen damit in Betracht. Die Software ermöglicht aber keine automatische Separierung der verschiedenen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe hinsichtlich der vorgesehenen Detektionskanäle während der Untersuchung an einer Probe.

5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu schaffen, mit dem die verschiedenen in einem mikroskopischen System vorhandenen Detektionskanäle derart eingestellt werden, dass eine eindeutige und automatische Trennung der Emissionsspektren der in einer Probe vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe möglich ist.

10 Die objektive Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das die Merkmale des kennzeichnenden Teils des Patentanspruchs 1 aufweist.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung können den Unteransprüchen entnommen werden.

15 In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

Fig. 1 ein schematisches Ausführungsbeispiel eines konfokalen Scanmikroskops;

20 Fig. 2 eine Ausführungsform eines Scanmikroskops, bei dem vor dem mindestens einen Detektor als Selektionsmittel ein SP Modul angeordnet ist;

Fig. 3 eine schematische Ausführungsform eines User Interfaces, mit dem der Benutzer eine Anzahl gewünschter Kanäle einstellen kann;

25 Fig. 4 die Absorptionsspektren von drei Fluoreszenzfarbstoffen, die in der Probe vorgesehen sind;

Fig. 5 die Emissionsspektren von den drei Fluoreszenzfarbstoffen, die in der Probe vorgesehen sind;

Fig. 6 die Emission der in der Probe vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 357 nm.

5 Fig. 7 die Emission der in der Probe vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm

Fig. 8 die Emission der in der Probe vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 576 nm

10 Fig. 9 die Emission der in der Probe vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei der Anregung mit den drei verschiedenen Wellenlängen von 357nm, 488nm und 576nm.;

15 Fig. 10 die Differenz des Emissionsspektrums für einen in der Probe vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoff von den gemessenen Emissionsspektren der in der Probe vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm; und

20 Fig. 11 das Quadrat der Differenz des Emissionsspektrums für einen in der Probe vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoff von den gemessenen Emissionsspektren der in der Probe vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm.

25 In Fig. 1 ist das Ausführungsbeispiel eines konfokalen Scanmikroskops 100 schematisch gezeigt. Dies soll jedoch nicht als Beschränkung der Erfindung aufgefasst werden. Es ist dem Fachmann hinlänglich klar, dass die Erfindung auch mit einem konventionellen Scanmikroskop oder mikroskopischen System realisiert werden kann. Der von mindestens einem Beleuchtungssystem 1 kommende Beleuchtungslichtstrahl 3 wird von einem Strahlteiler oder einem 30 geeigneten Umlenkmittel 5 zu einem Scanmodul 7 geleitet. Der Beleuchtungslichtstrahl 3 kann sich dabei aus mehreren

Anregungswellenlängen zusammensetzen, mit denen die verschiedenen in einer Probe vorhandenen Farbstoffe angeregt werden. Bevor der Beleuchtungslichtstrahl 3 auf das Umlenkmittel 5 trifft, passiert dieser ein Beleuchtungspinhole 6. Das Scanmodul 7 umfasst einen kardanisch 5 aufgehängten Scanspiegel 9, der den Beleuchtungslichtstrahl 3 durch eine Scanoptik 12 und eine Mikroskopoptik 13 hindurch über bzw. durch eine mit mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Probe 15 führt. Der Beleuchtungslichtstrahl 3 wird bei nicht transparenten Proben 15 über die Probenoberfläche geführt. Bei biologischen Proben 15 (Präparaten) oder 10 transparenten Proben kann der Beleuchtungslichtstrahl 3 auch durch die Probe 15 geführt werden. Dies bedeutet, dass verschiedene Fokusebenen der Probe 15 nacheinander durch den Beleuchtungslichtstrahl 3 abgetastet werden. Mit den Scanmodul 7 ist ein Positionssensor 11 verbunden, der die 15 Positionsdaten der aufgenommenen Bilddaten bestimmt. Die nachträgliche Zusammensetzung der Positionsdaten und der Bilddaten ergibt dann einen zwei- oder dreidimensionalen Frame (bzw. Bild) der Probe 15. Der vom Beleuchtungssystem 1 kommende Beleuchtungslichtstrahl 3 ist als 20 durchgezogene Linie dargestellt. Das von der Probe 15 ausgehende Licht definiert einen Detektionslichtstrahl 17. Dieser gelangt durch die Mikroskopoptik 13, die Scanoptik 12 und über das Scanmodul 7 zum Umlenkmittel 5, passiert dieses und gelangt über ein Detektionspinhole 18 auf mindestens einen Detektor 19, der mindestens zwei Kanäle umfasst. Jeder 25 der Kanäle kann als Photomultiplier ausgeführt sein. Es ist dem Fachmann klar, dass auch andere Detektionskomponenten, wie z.B. Dioden, Diodenarrays, Photomultiplierarrays, CCD Chips oder CMOS Bildsensoren eingesetzt werden können. Der von der Probe 15 ausgehende bzw. definierte Detektionslichtstrahl 17 ist in Fig. 1 als gestrichelte Linie dargestellt. Im Detektor 19 werden elektrische, zur Leistung des von der Probe 15 ausgehenden Lichtes, proportionale Detektionssignale erzeugt. Da von der 30 Probe 15 Licht nicht nur einer Wellenlänge ausgesandt wird, ist es sinnvoll vor den verschiedenen Kanälen des mindestens einen Detektors 19 ein Selektionsmittel 21 für das von der Probe 15 ausgehende Spektrum einzufügen. Die vom Detektor 19 erzeugten Daten werden an ein

Rechnersystem 23 weitergegeben. Dem Rechnersystem 23 ist mindestens ein Peripheriegerät 27 zugeordnet. Das Peripheriegerät kann z.B. ein Display sein, auf dem der Benutzer Hinweise zur Trennung des von der Probe 15 ausgehenden Spektrums erhält. Auf dem Display ist z.B. auch ein User-  
5 Interface dargestellt, wie es z.B. in Fig. 3 gezeigt ist. Ferner ist mit dem Rechnersystem 23 ein Eingabemittel zugeordnet, das z.B. aus einer Tastatur 28, einer Einstellvorrichtung 29 für die Komponenten des Mikroskopsystems und einer Maus 30 besteht.

Fig. 2 zeigt die Ausführungsform eines Scannmikroskops, bei dem vor dem  
10 mindestens einen Detektor 19 als Selektionsmittel ein SP Modul 20 angeordnet ist. Auch andere Selektionsmittel, wie z.B. ein Mikrospiegel-Array, sind denkbar. Alle anderen in Fig. 2 gezeigten Elemente stimmen mit denen aus Fig. 1 überein, so dass sie bei der Beschreibung zu Fig. 2 nicht noch einmal erwähnt werden müssen. Das SP Modul 20 (Fig. 2) nimmt einen  
15 kompletten Lambda Scan auf, d.h., dass für jeden Probenpunkt alle von der Probe 15 ausgehenden Wellenlängen aufgezeichnet werden. Die Daten werden an das Rechnersystem 23 übertragen und können dann in einer vom Benutzer bestimmbaren Weise auf dem Display 27 dargestellt werden. Der Detektionslichtstrahl 17 wird mit einem Prisma 31 räumlich spektral  
20 aufgespalten. Eine weitere Möglichkeit der spektralen Aufspaltung ist die Verwendung eines Reflexions-, oder Transmissionsgitters. Der spektral aufgespaltene Lichtfächer 32 wird mit der Fokussieroptik 33 fokussiert und trifft anschließend auf eine Spiegelblendenanordnung 34, 35. Die Spiegelblendenanordnung 34, 35, die Mittel zur spektralen, räumlichen  
25 Aufspaltung (Prisma 67), die Fokussieroptik 33 und die Detektoren 36 und 37 werden zusammen als SP-Modul 20 (oder Mutibanddetektor) bezeichnet. Wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, kann mittels der Spiegelblendenanordnung 34, 35 ein gewünschter Teil des Spektrums ausgewählt werden. Dazu wird je nach der ermittelten Trennung die Spiegelblendenanordnung 34, 35 im SP-Modul 20  
30 entsprechend verstellt, um nur bestimmte Teile des von der Probe 15 ausgehenden Spektrums auf jeweils einen einzelnen Detektor zu richten. Ein Teil des aufgespaltenen Lichtfächers 32 des Detektionslichtstrahls 17, der nur Licht des vorgewählten Spektralbereichs umfasst, passiert die

Spiegelblendenanordnung 34, 35 und wird von dem Detektor 36, der als Photomultiplier ausgeführt ist detektiert. Ein anderer Teil des aufgespaltenen Lichtfächers 32 wird an der Spiegelblendenanordnung 35 reflektiert und gelangt zu Detektor 37, der ebenfalls als Photomultiplier ausgeführt ist. Die

5 Spiegelblendenanordnungen 34, 35 sind, in den durch die Doppelpfeile illustrierten Richtungen verschiebbar, so dass die spektralen Detektionsbereiche des den Detektoren 36, 37, zugeführten Lichtes kontinuierlich einstellbar sind. Es ist möglich, jedoch der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt, noch weitere Detektoren einzubauen und weiteren

10 Spiegelblenden zuzuordnen. In den Detektoren 36, 37 werden elektrische, zur Leistung des von der Probe 15 ausgehenden Detektionslichtstrahls 17 des jeweiligen Spektralbereichs proportionale Detektionssignale erzeugt, die in dem Rechnersystem 23 den in der Strahlablenkeinrichtung mit Hilfe eines Positionssensors erfassten Positionssignalen zugeordnet werden.

15 In Fig. 3 ist ein Teil einer schematischen Ausführungsform eines User Interfaces 40 dargestellt mit dem der Benutzer eine Anzahl gewünschter Kanäle einstellen kann. Die beste Einstellung wird dem Benutzer vom System vorgeschlagen. Aufgrund des Vorschlags werden hierzu auf dem User Interface 40 Selektionsschieber 41<sub>green</sub>, 41<sub>red</sub>, 41<sub>blue</sub> oder 41<sub>gray</sub> durch den

20 Benutzer entsprechend des Vorschlags eingestellt. Die Verstellung durch den Benutzer resultiert im SP Modul 30 in einer entsprechenden Verstellung der Spiegelschieber 34 und 35. Ebenso kann die Einstellung bzw. Verstellung der Spiegelschieber aufgrund der vom Rechnersystem 23 errechneten Kanaltrennung automatisch erfolgen.

25 Die berechneten Daten der Kanäle werden dem Benutzer auf dem Display 27 angezeigt, wobei in die Darstellung alle möglichen Darstellungsmodi (Overlay, Volume Rendering etc.) mit einbezogen werden können. Um die Darstellung auf dem Display 27 zu erzielen ist wie in Fig. 3 gezeigt der Simulator 104 mit dem Rechnersystem 23 verbunden. Der Benutzer kann, ohne das Objekt 15

30 zu belasten (durch Strahlung, thermisch, etc.), entsprechend lange weiter machen bis er mit dem am Display 27 dargestellten Bild zufrieden ist. Auf Knopfdruck wird die Einstellung gespeichert und als Filtermakro bzw. Einstellmakro des SP Moduls 30 für weitere Arbeiten mit dem selben Objekt

15 oder ähnlichen Objekten zur Verfügung gestellt. In dem in Fig. 4a dargestellten Teil des User Interfaces 40 ist das Scannmikroskop ebenfalls schematisch abgebildet, und dem Benutzer wird eine Vielzahl von Einstellmöglichkeiten zur Verfügung gestellt. In der beschriebenen 5 Ausführungsform ist ein erster Laser 45 und ein zweiter Laser 47 vorgesehen, die beide schematisch als Box dargestellt sind. Der erste Laser 45 ist z.B. ein Argon UV Laser (ArUV Laser) der Licht einer ersten Wellenlänge von 351nm und Licht einer zweiten Wellenlänge von 364nm emittiert. Der zweite Laser 45 ist z.B. ein Argon Krypton Laser (ArKr Laser) der Licht einer ersten 10 Wellenlänge von 476nm, Licht einer zweiten Wellenlänge von 514nm, Licht einer dritten Wellenlänge von 568nm und Licht einer vierten Wellenlänge von 647nm emittiert. In jeder Box ist für jede der verfügbaren Wellenlängen ein Schieberegler 50 vorgesehen, über die der prozentuale Anteil der Laserleistung der jeweiligen Wellenlänge einstellbar ist. Ebenso ist in jeder 15 Box eine Anzeige 46, 48 vorgesehen, die auf den Betriebszustand des jeweiligen Lasers hinweist, bzw. über die der Laser ein- oder ausschaltbar ist. Neben der Box für den zweiten Laser 47 ist eine Datenstruktur 52 dargestellt, wie die Daten auf dem Speicher des Rechnersystems 23 abgelegt sind. Schematisch ist auf dem Display ebenfalls die Probe 15 und ein von den 20 Lasern 45, 47 kommender Lichtstrahl 55, ein von der Probe 15 transmittierter Lichtstrahl 56 und ein von der Probe 15 reflektierter Lichtstrahl 57 dargestellt. Die Lichtstrahlen werden durch eine schematisch dargestellte Strahlumlenleinrichtung 58 entsprechend gelenkt. Der von der Probe 15 kommende Lichtstrahl 57 weist auf eine Darstellung eines Spektrums 60. In 25 dem Spektrum 60 sind die vom ersten und zweiten Laser 45, 47 emittierten Linien eingetragen. Ebenso ist die Intensität und die spektrale Lage des von der Probe 15 reflektierten Lichts 57 in dem Spektrum 60 dargestellt. In dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel sind im Spektrum 60 eine erste Intensitätskurve 62, eine zweite Intensitätskurve 64 und eine dritte 30 Intensitätskurve 66 dargestellt. Unterhalb des Spektrums 60 ist eine Skala 68 vorgesehen, die als eine Orientierungshilfe für die darunter angeordneten Selektionsschieber 41<sub>green</sub>, 41<sub>red</sub>, 41<sub>blue</sub> oder 41<sub>gray</sub> dient. Die Selektionsschieber 41<sub>green</sub>, 41<sub>red</sub>, 41<sub>blue</sub> oder 41<sub>gray</sub> werden mit der Maus oder

einem ähnlichen Mittel auf dem User Interface 40 bewegt. Unterhalb der Selektionsschieber  $41_{green}$ ,  $41_{red}$ ,  $41_{blue}$  oder  $41_{gray}$  ist ein erster Detektor 74, ein zweiter Detektor 75, ein dritter Detektor 76 und ein vierter Detektor 77 ebenfalls schematisch als Box dargestellt. In jeder Box ist eine Anzeige zur 5 Farbstoffauswahl vorgesehen. Die Anzeige 78 ist als Drop Down Anzeige ausgestaltet, so dass der Benutzer auf einfache Weise einen anderen in der Probe 15 vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff wählen kann. Ferner ist jeder Box eine Farbangabe 79 zugeordnet, die angibt wie die Signale des jeweiligen Detektors zur Bildzeugung auf dem Display verwendet werden. Der 10 Betriebszustand eines jeden Detektors ist in jeder Box über ein aktivierbares Kästchen 80 angezeigt. Dem von der Probe 15 transmittiertem Licht ist ein fünfter Detektor 82 zugeordnet, der ebenfalls die Anzeige 78 für den durch den Detektor 82 detektierten Farbstoff, die Box für die Farbangabe 79 und das aktivierbare Kästchen 80 aufweist.

15 Fig. 4 zeigt die Absorptionsspektren von drei Fluoreszenzfarbstoffen, die in der Probe 15 vorgesehen sind. Dabei ist auf der Abszisse die Wellenlänge aufgetragen und auf der Ordinate sind relative Einheiten aufgetragen. Das erste Absorptionsspektrum 100 steht für den Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. Das zweite Absorptionsspektrum 101 steht für den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. 20 Das dritte Absorptionsspektrum 102 steht für den Fluoreszenzfarbstoff FITC.

Fig. 5 zeigt die Emissionsspektren von drei Fluoreszenzfarbstoffen, die in der Probe 15 vorgesehen sind. Dabei ist auf der Abszisse die Wellenlänge aufgetragen und auf der Ordinate sind relative Einheiten aufgetragen. Das erste Emissionsspektrum 110 steht für den Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. 25 Das zweite Emissionsspektrum 111 steht für den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Das dritte Emissionsspektrum 112 steht für den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Die verschiedenen Emissionsspektren 110, 111 und 112 für die Fluoreszenzfarbstoffe Texas Red, DAPI und FITC oder auch andere in der Probe 15 vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe sind in einer Datenbank 30 abgelegt, die im Rechnersystem 23 implementiert ist.

Fig. 6 zeigt die Emission 115 der in der Probe 15 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 357 nm. Dabei ist auf der Abszisse die Wellenlänge aufgetragen und auf der Ordinate sind relative Einheiten aufgetragen. Das erste Emissionsspektrum 110 steht 5 für den Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. Das zweite Emissionsspektrum 111 steht für den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Das dritte Emissionsspektrum 112 steht für den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Dabei sind 100% der Emission 115 auf DAPI zurückzuführen. 8% der Emission 115 werden von FITC beigetragen. 7% der Emission 115 werden von Texas Red beigetragen.

10 Fig. 7 zeigt die Emission 116 der in der Probe 15 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dabei ist auf der Abszisse die Wellenlänge aufgetragen und der Ordinate sind relative Einheiten aufgetragen. Das erste Emissionsspektrum 110 steht für 15 den Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. Das zweite Emissionsspektrum 111 steht für den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Das dritte Emissionsspektrum 112 steht für den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Dabei sind 0% der Emission 116 auf DAPI zurückzuführen. 88% der Emission 116 werden von FITC beigetragen. 7% der Emission 116 werden von Texas Red beigetragen.

15 Fig. 8 zeigt die Emission 117 der in der Probe 15 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 576 nm. Dabei ist auf der Abszisse die Wellenlänge aufgetragen und der Ordinate sind relative Einheiten aufgetragen. Das erste Emissionsspektrum 110 steht für 20 den Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. Das zweite Emissionsspektrum 111 steht für den Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Das dritte Emissionsspektrum 112 steht für den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Dabei sind 0% der Emission 117 auf DAPI zurückzuführen. 0% der Emission 117 werden von FITC beigetragen. 99% der Emission 117 werden von Texas Red beigetragen.

25 Fig. 9 zeigt in einer Graphik die gesamten Emissionen 115, 116 und 117 der in der Probe 15 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei den verschiedenen Anregungen. Die Emissionen der in Fig. 6, Fig. 7 und Fig. 8 dargestellten Emissionen sind in einer graphischen Darstellung zusammengeführt. Dabei ist 30 auf der Abszisse die Wellenlänge aufgetragen und der Ordinate sind relative

Einheiten aufgetragen. Die erste Emission 115 steht für die Anregung der drei in der Probe 15 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei der Anregung von 357nm. Die zweite Emission 116 steht für die Anregung der drei in der Probe 15 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei der Anregung von 488nm. Die 5 dritte Emission 117 steht für die Anregung der drei in der Probe 15 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe bei der Anregung von 576nm. In Fig. 9 ist eine Ausführungsform für die Bestimmung von Trennpunkten 118, um einen bestimmten Teil des Emissionsspektrum einem bestimmten Kanal zuzuordnen. Die Trennpunkte 118 werden dadurch bestimmt, dass 10 Schnittpunkte 119 der Emission 115, 116 und 117 auf die Abszisse projiziert werden. Es ergibt sich eine Trennung, wobei ein erster Kanal 131 den Wellenlängenbereich von 400 – 520 nm, ein zweiter Kanal 132 den Wellenlängenbereich von 520 – 580 nm und ein dritter Kanal 133 den Wellenlängenbereich von 580 – 750 nm umfasst.

15 Die Fign. 6-9 beschreiben die Verhältnisse, falls innerhalb des interessierenden Bildbereichs (Pixels) alle Farbstoffe vorkommen (Kolokalisation). Sind nicht alle Farbstoffe gleichzeitig vorhanden, vereinfachen sich die Verhältnisse entsprechend.

20 In den nachfolgenden Fign.10 und 11 geht es um die Zuordnung / Identifizierung von gemessenen Farbstoffen im Vergleich zu Referenzspektren, die z.B. in Speicher des Rechnersystems 23 hinterlegt sind.

25 Fig. 10 zeigt die Differenz des Emissionsspektrums für einen in der Proben vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoff von dem Emissionsspektrum der in der Probe vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dabei ist auf der Abszisse die Wellenlänge aufgetragen und der Ordinate sind relative Einheiten aufgetragen. Das erste Differenzspektrum 120 steht für die Differenz des Emissionsspektrums des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI von dem Emissionsspektrum der 30 Fluoreszenzfarbstoffe in der Probe bei der Anregung mit einer Wellenlänge von 488nm. Das zweite Differenzspektrum 121 steht für die Differenz des Emissionsspektrums des Fluoreszenzfarbstoffs FITC von dem

Emissionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe in der Probe bei der Anregung mit einer Wellenlänge von 488nm. Das dritte Differenzspektrum 122 steht für die Differenz des Emissionsspektrums des Fluoreszenzfarbstoffs Texas Red von dem Emissionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe in der Probe bei der 5 Anregung mit einer Wellenlänge von 488nm.

Fig. 11 zeigt das Quadrat der Differenz des Emissionsspektrums für einen in der Proben vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoff von den gemessenen Emissionsspektren der in der Probe vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dabei ist auf der Abszisse 10 die Wellenlänge aufgetragen und der Ordinate sind relative Einheiten aufgetragen. Das erste Quadrat 123 ist das des ersten Differenzspektrum 120 des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI. Das zweite Quadrat 124 ist das des zweiten Differenzspektrum 121 des Fluoreszenzfarbstoffs FITC. Das dritte Quadrat 125 ist das des dritten Differenzspektrum 122 des Fluoreszenzfarbstoffs 15 Texas Red. Eine Zuordnung kann einfach dadurch erfolgen, dass das Integral des Betragsquadrats (siehe Fig. 11) minimal sein muß. Hier für FITC gegeben.

Die optimale Einstellung der Wellenlängenbereiche für die Trennung der einzelnen Kanäle ist nachfolgend beschrieben.

20 Ein Trennungs-Algorithmus wird durch den Übergang in den Hyperraum angewandt, der durch die verwendeten Kanäle aufgespannt wird. Die Farbstoffe werden dann als Linearkombinationen der Kanäle beschrieben. Ohne Einschränkung wird hier mit auf Eins normierten Vektoren gerechnet. Gemäß der Kanaltrennung, wie z.B. in Fig. 9, wobei der erste Kanal 131 den 25 Wellenlängenbereich von 400 – 520 nm, der zweite Kanal 132 den Wellenlängenbereich von 520 – 580 nm und der dritte Kanal 133 den Wellenlängenbereich von 580 – 750 nm umfasst.

Die integrale der Intensitätsverteilung innerhalb dieser Kanäle ergibt sich dann für DAPI zu (0.80, 0.25, 0.09), für FITC zu (0.42, 0.49, 0.05) für Texas-Red zu 30 (0, 0.13, 0.33). Nach der Projektion auf die Einheitskugel und normiert ergibt dies folgende Vektoren: für DAPI (0.95, 0.30, 0.10), für FITC (0.65, 0.76, 0.08) und für Texas-Red: (0, 0.37, 0.93).

Das Auswahlkriterium für diesen Algorithmus ist dann, dass die Winkel zwischen den Einheitsvektoren der Farbstoffe maximal werden, entsprechend einer maximalen Trennung. Als Parameter werden die Grenzen für die Detektionsbänder geschoben. Mathematisch gesprochen wird bei diesem

- 5 Vorgehen die Summe der Betragsquadrate der Skalarprodukte zu minimieren sein, was eine herkömmliche Extremwertaufgabe ist. Als Randbedingung für die Grenzen der Wellenlängenbereiche bzw der Detektionsbänder kann z.B. gestellt werden, dass der zur Verfügung stehende Spektralbereich maximal ausgenutzt wird, und so das Signal/Rausch-Verhältnis optimiert wird.
- 10 Für bekannte Farbstoffe können die optimalen Detektionsbänder aus den Farbstoff-Emissionswerten berechnet werden, die in einem Speicher des Rechnersystems 23 abgelegt sein können. Für noch nicht bekannte Farbstoffe dienen die nacheinander aufgenommenen Spektren.  
Es ist selbstverständlich, dass die Beschreibung des Verfahrens mit den drei
- 15 Fluoreszenzfarbstoffen nicht als Beschränkung aufgefasst werden kann. Eine zu untersuchende Probe kann mit beliebigen Fluoreszenzfarbstoffen versehen sein. Das Verfahren ist unabhängig von der Verwendung bestimmter Fluoreszenzfarbstoffe.
- 20 Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Separierung von Detektionskanälen, wobei eine Probe (15) mit mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffen versehen ist, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

5 a) Ermitteln eines Emissionsspektrums der mindestens zwei Fluoreszenzfarbstoffe, wobei die Probe (15) mit unterschiedlichen Wellenlängen anregbar ist, wobei die Zahl der unterschiedlichen Wellenlängen die Anzahl der in der Probe (15) vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe nicht übersteigt;

10 b) Bestimmen der Trennpunkte des Emissionsspektrums bezüglich der Wellenlänge, um den entsprechenden Teil des Emissionsspektrums jeweils einem bestimmten Kanal zuzuordnen und mit diesem Kanal zu erfassen; und

15 c) Einstellen der Trennung der mindestens zwei Kanäle derart, dass die aufgrund der Trennpunkte ermittelten Teile des gesamten Emissionsspektrums jeweils unterschiedlichen Kanälen zur Detektion zugeführt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die 20 Trennpunkte der Teile des Emissionsspektrums durch die Schnittpunkte der einzelnen eines jeden in der Probe vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoff definiert werden.

25 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennpunkte der Teile des Emissionsspektrums dadurch ermittelt werden, dass die Differenz zwischen dem gemessenen Emissionsspektrum der biologischen Probe und einem Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge gebildet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass aus der Differenz zwischen dem gemessenen Emissionsspektrum der biologischen Probe und einem Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge das Integral des Betragsquadrats gebildet wird und die Trennpunkte durch das 5 Minimum des Integrals bestimmt sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des jeweils einen Kanals mit mindestens einem Detektorelement durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das 10 Detektorelement aus mehreren, zusammengefassten Detektoren besteht.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass Signale mehrerer Detektoren eines Multi-Anoden-Photomultiplier zu einem Kanal in zusammengefasst.
8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das 15 mindestens eine Detektorelement ein Photomultiplier ist.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zum Einstellen der Trennung der mindestens zwei Kanäle ein Selektionsmittel (30) vorgesehen ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das 20 Selektionsmittel ein Mikrospiegel-Array ist.
11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Selektionsmittel ein SP-Modul ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das SP- 25 Modul (30) eine Spiegelblendenanordnung (34, 35) umfasst, mit der aufgrund der ermittelten Trennpunkte die Spiegelblendenanordnung (34, 35) derart eingestellt wird, dass jeder der durch die Trennpunkte festgelegte Wellenlängenbereich jeweils einem einzelnen Kanal zugeordnet wird.
13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennpunkte mittels eines Rechnersystems (23) ermittelt werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Daten der ermittelten Trennpunkte dem Benutzer auf einem Display (27) dargestellt werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Benutzer aufgrund der auf dem Display (27) dargestellten Daten die Spiegelblendenanordnung (34, 35) einstellt.
16. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Spiegelblendenanordnung (34, 35) oder das Mikrospiegel-Array aufgrund der vom Rechnersystem (23) ermittelten Trennpunkte automatisch derart eingestellt wird, dass die durch die Trennpunkte bestimmten Wellenlängenbereiche jeweils einem Kanal zugeordnet werden.

Zusammenfassung

Es ist ein Verfahren zur Separierung von Detektionskanälen offenbart, wobei  
eine Probe (15) mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen  
5 versehen ist. Zunächst wird das Emissionsspektrum von mindestens zwei  
Fluoreszenzfarbstoffen ermittelt. Aus den Emissionsspektren werden die  
Trennpunkte der Wellenlänge bzw. der einzelnen Detektionskanäle bestimmt.  
Schließlich erfolgt hierauf das Einstellen der Trennung der mindestens zwei  
Kanäle.

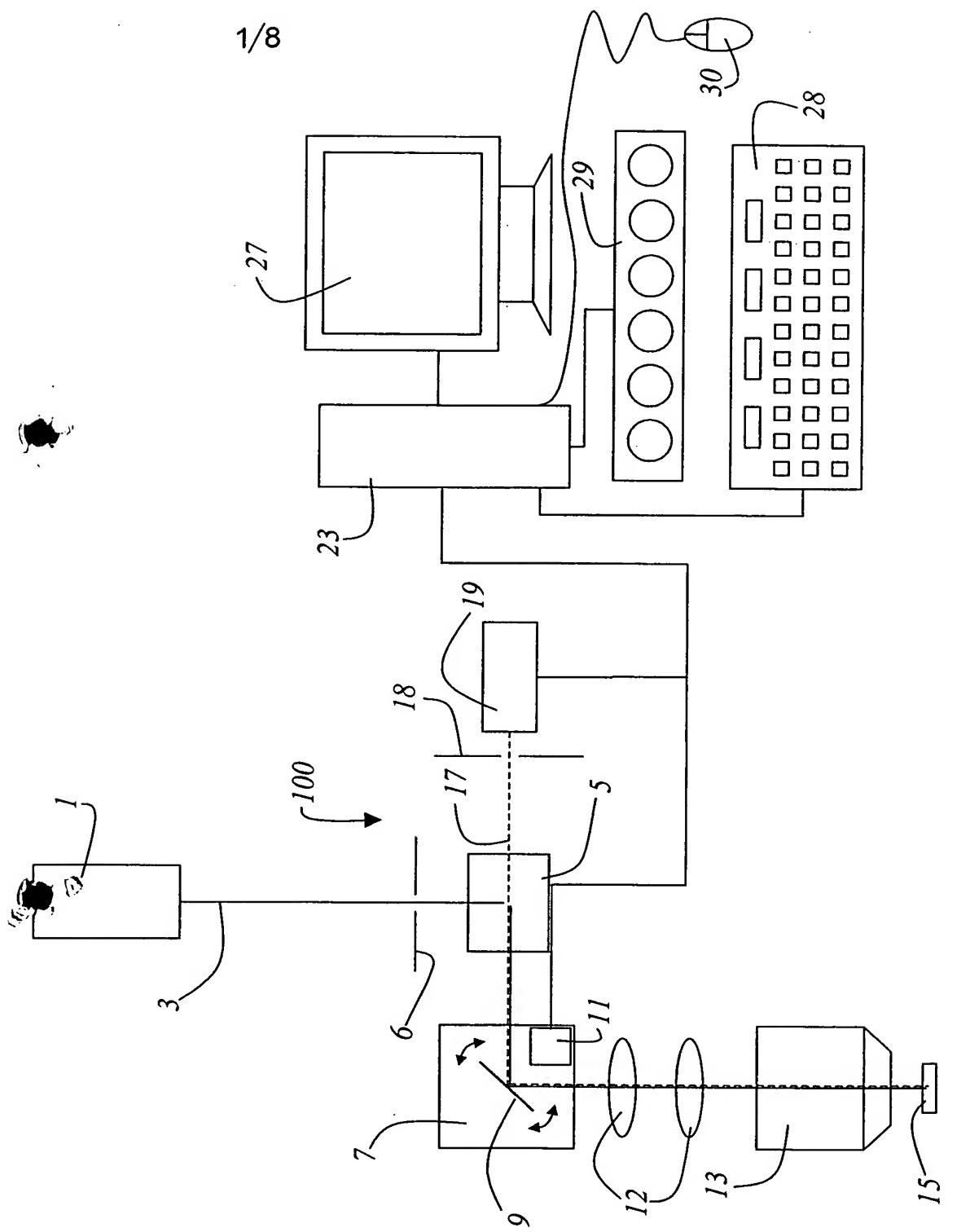
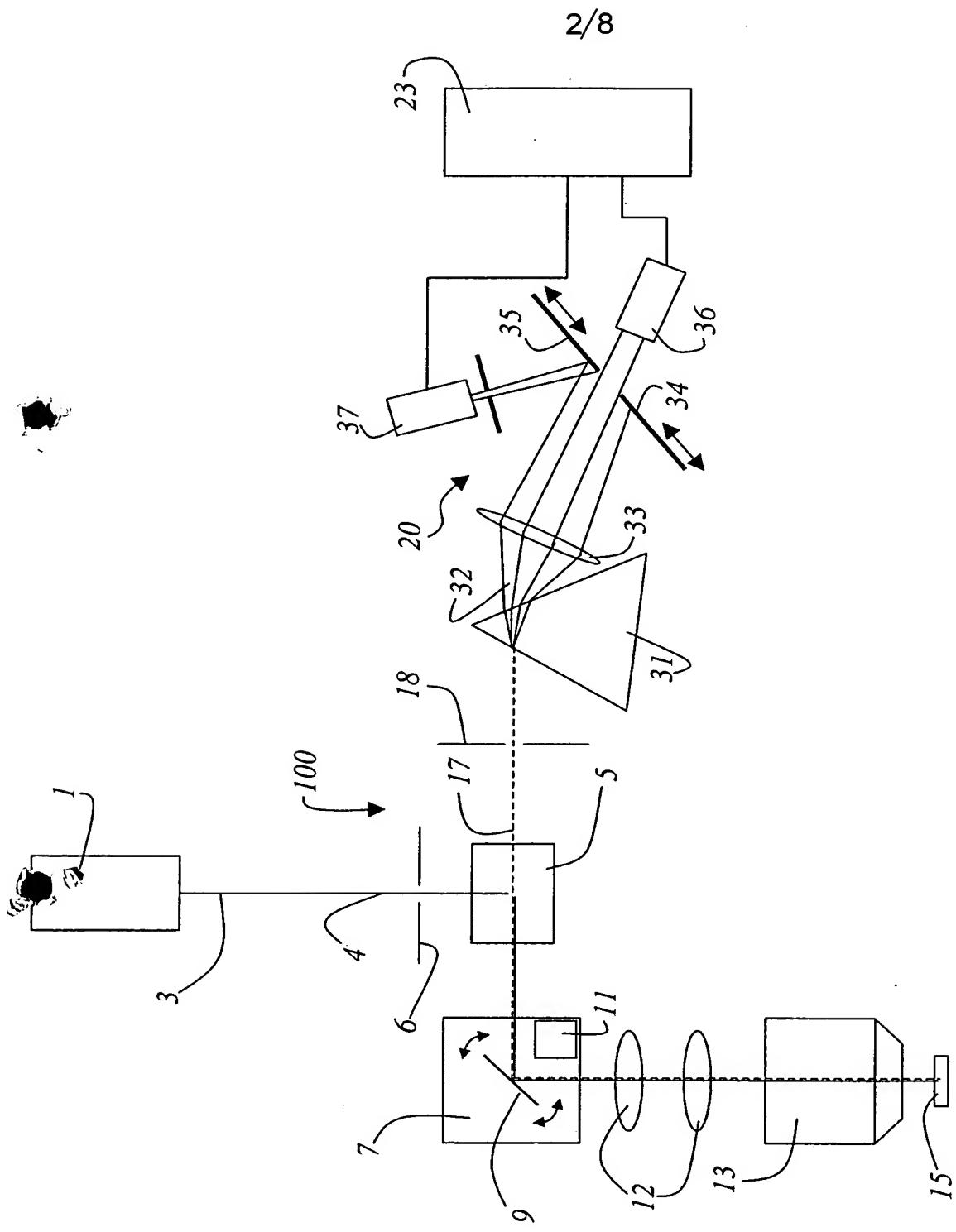
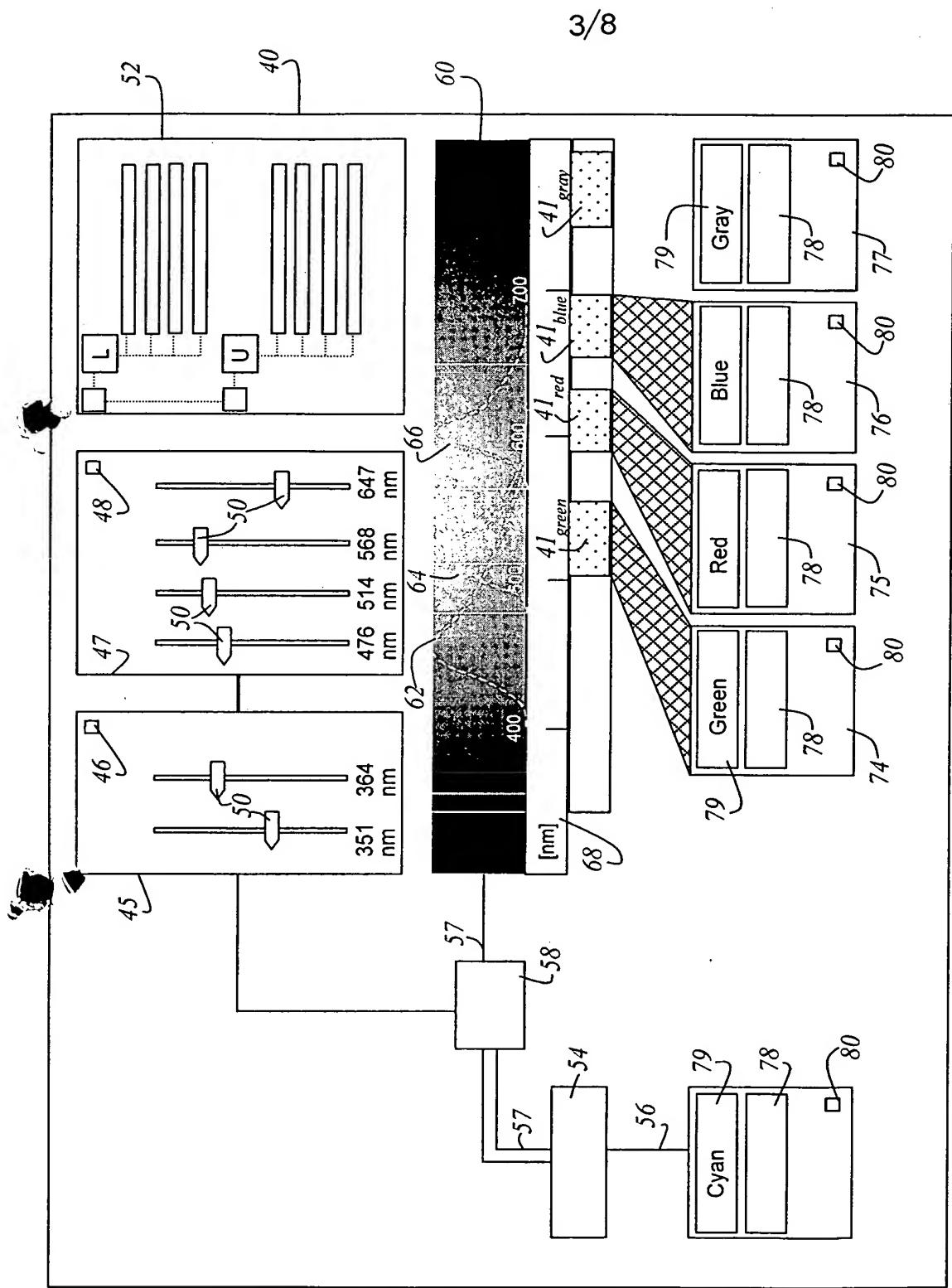


Fig. 1

Fig. 2





**Fig. 3**

## Absorptionspektrum

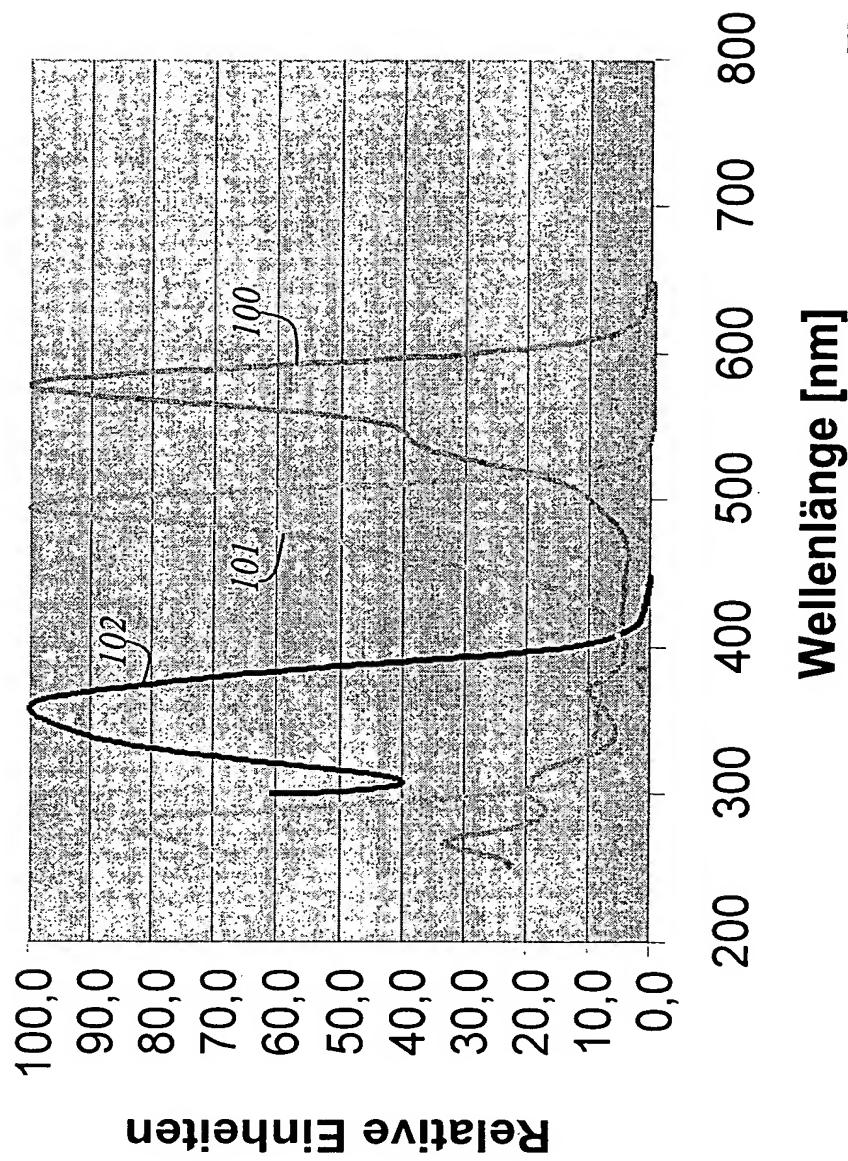


Fig. 4

## Emissionsspektrum

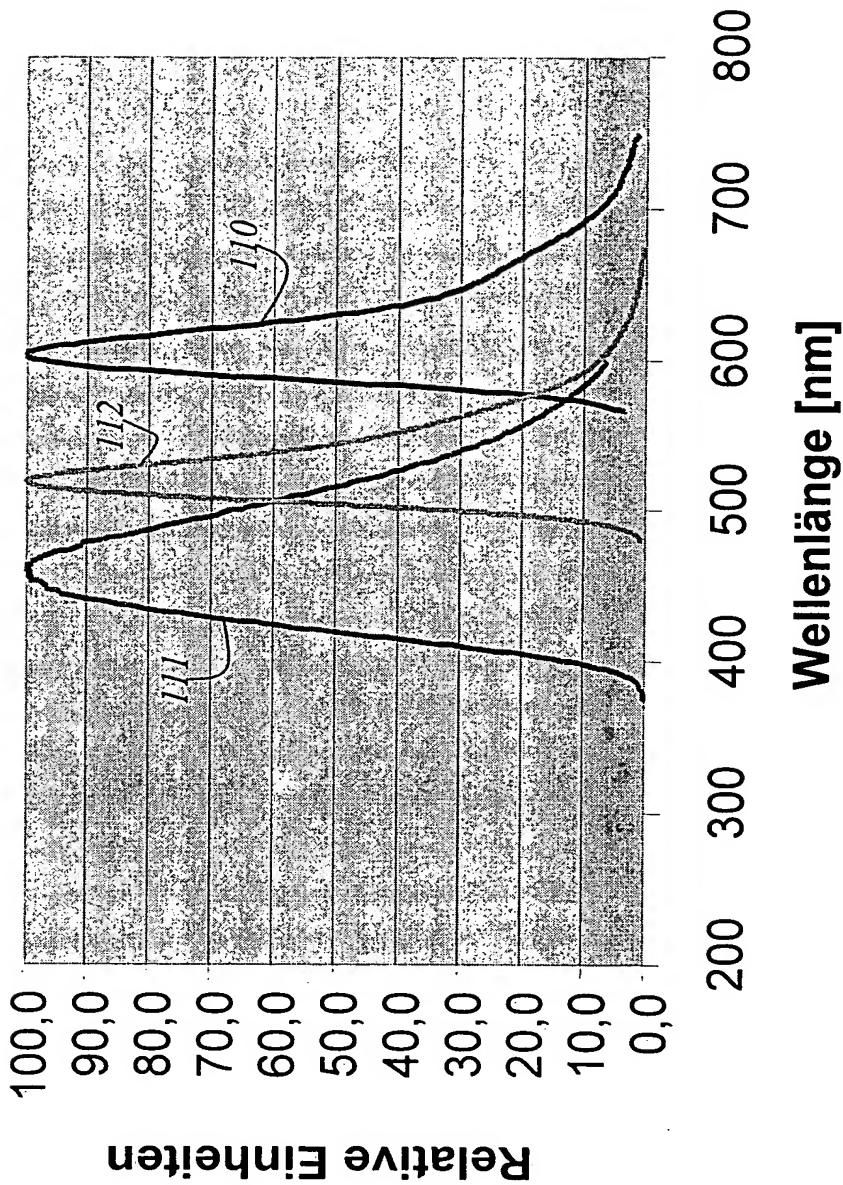


Fig. 5

6/8

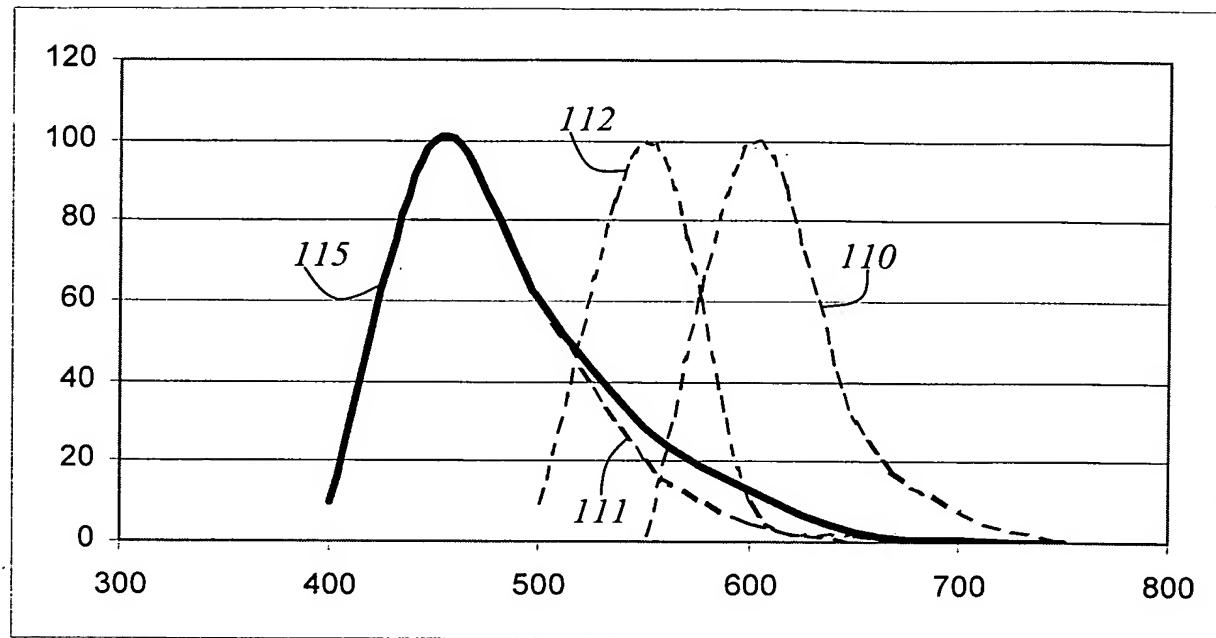


Fig. 6

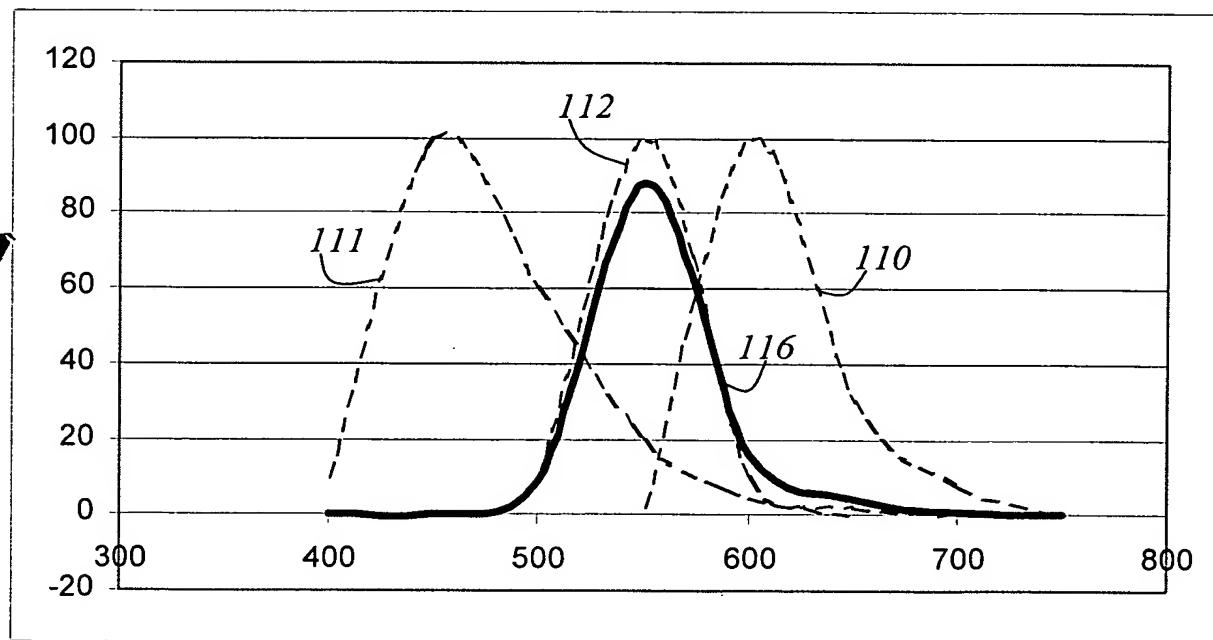


Fig. 7

7/8

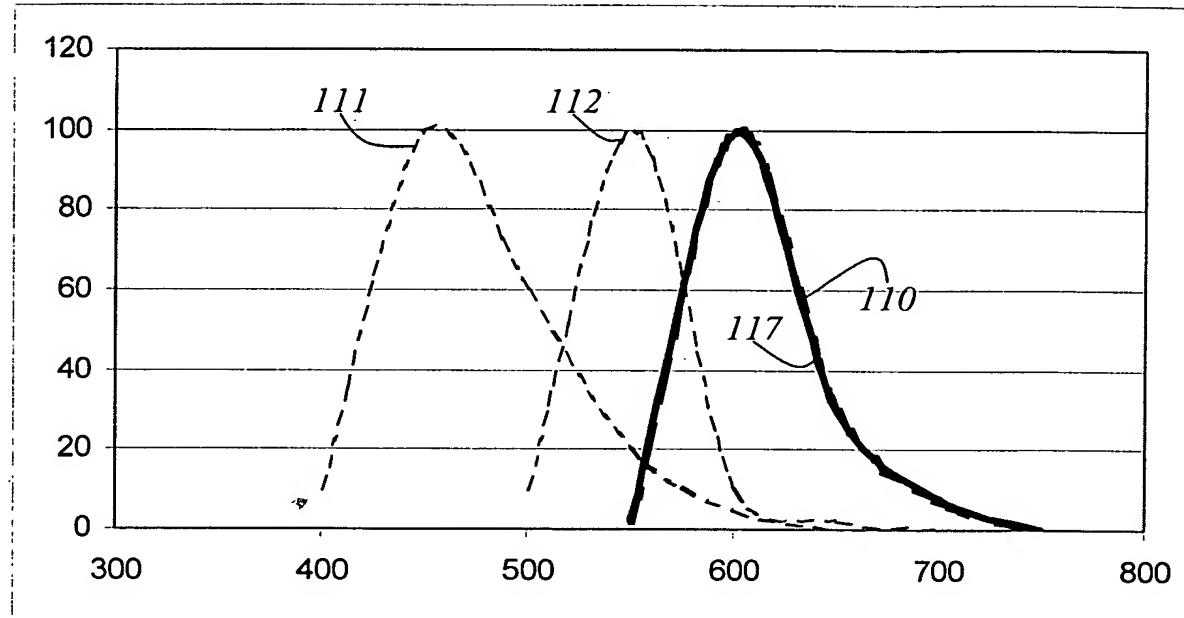


Fig. 8

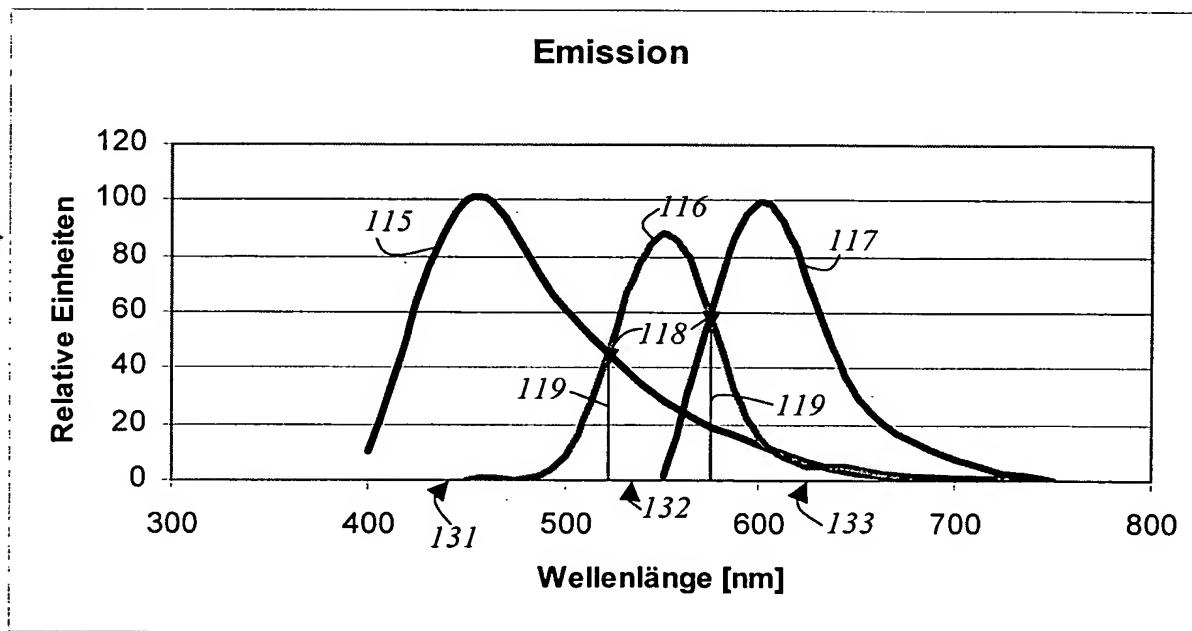


Fig. 9

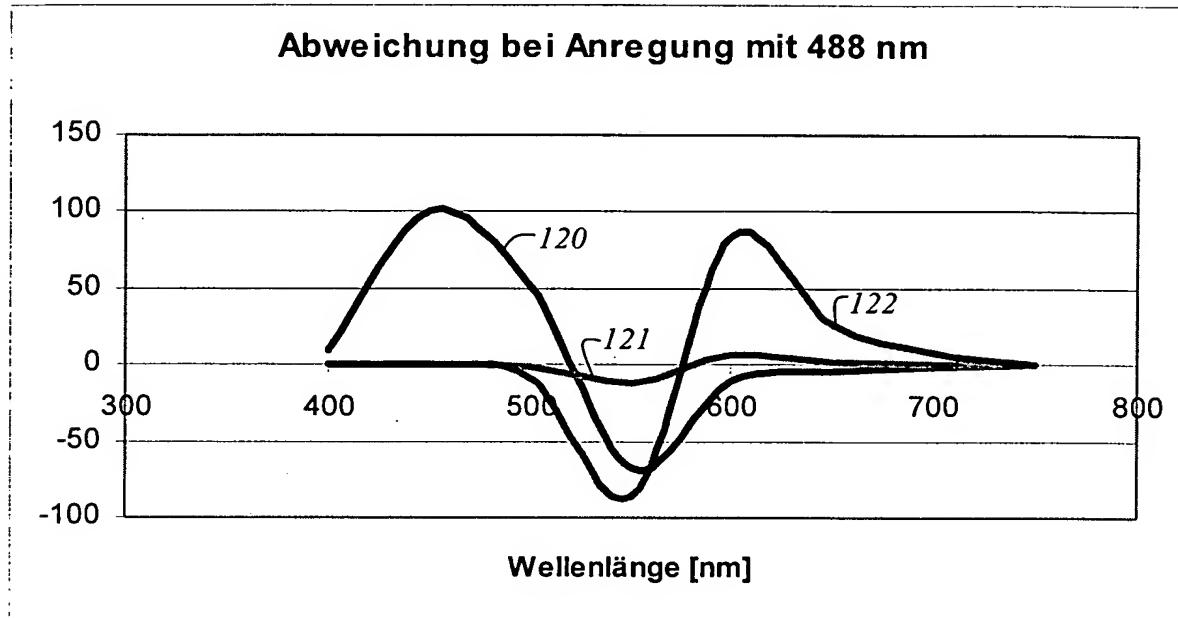


Fig. 10

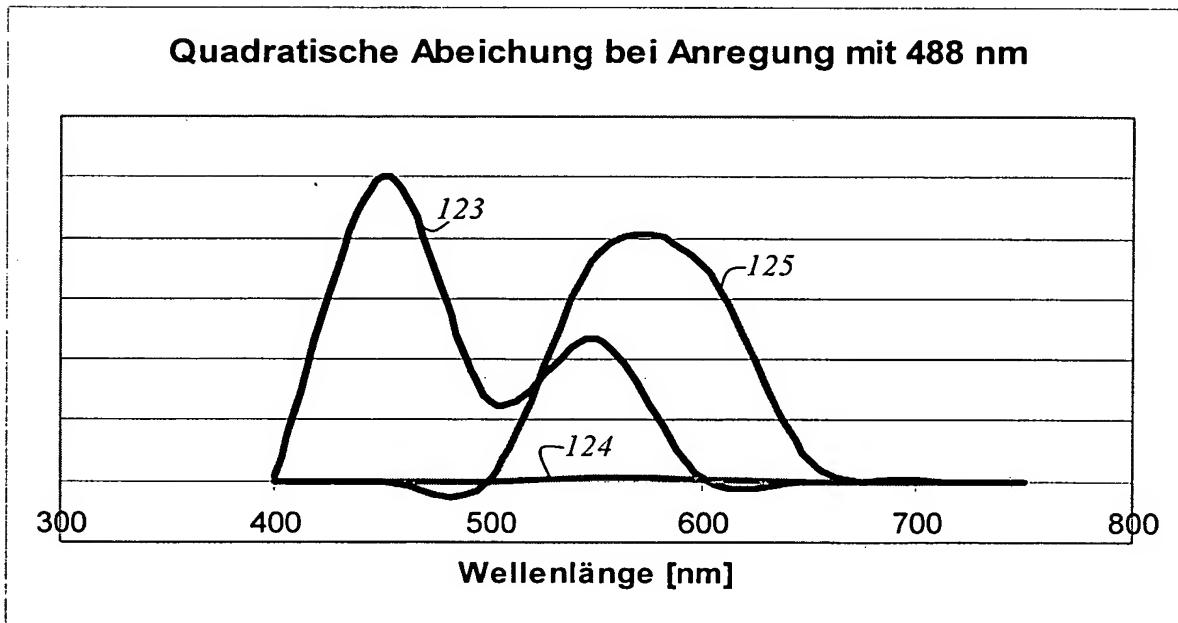


Fig. 11